

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ імені В. Н. КАРАЗІНА



АЙКЯН АРТЕМ ЗАВЕНОВИЧ

УДК 618.19-006.04/.44:611.018

**РОЛЬ M1 І M2 ФЕНОТИПІВ МАКРОФАГІВ У ІМУНОПАТОГЕНЕЗІ
АДЕНОКАРЦИНОМИ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ ПРИ НАЯВНОСТІ АБО
ВІДСУТНОСТІ МЕТАСТАЗІВ У РЕГІОНАРНИХ ЛІМФАТИЧНИХ
ВУЗЛАХ**

14.03.08 – імунологія та алергологія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук

Харків – 2021

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана у Полтавському державному медичному університеті Міністерства охорони здоров'я України.

Науковий керівник:

доктор медичних наук, професор
Кайдашев Ігор Петрович,
Полтавський державний медичний
університет,
Міністерство охорони здоров'я України,
проректор з наукової роботи.

Офіційні опоненти:

доктор медичних наук, професор
Курченко Андрій Ігорович,
Національний медичний університет імені
О. О. Богомольця Міністерства охорони
здоров'я України, м. Київ,
завідувач кафедри клінічної імунології та
алергології з секцією медичної генетики;

доктор медичних наук, професор
академік НАН України
Гольцев Анатолій Миколайович
Інститут проблем кріобіології і кріомедицини
Національної академії наук України,
радник при дирекції, завідувач відділу
кріопатофізіології і імунології.

Захист відбудеться «24» вересня 2021 р. о 14-00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 64.051.33 Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна за адресою: 61022, м. Харків, майдан Свободи, 6, ауд. 580.

З дисертацією можна ознайомитись у Центральній науковій бібліотеці Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна за адресою: 61022, м. Харків, майдан Свободи, 4.

Автореферат розісланий «23» серпня 2021 р.

Учений секретар
спеціалізованої вченої ради Д 64.051.33
доктор медичних наук, професор



Тетяна ЛЯДОВА

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Аденокарцинома або рак молочної залози (РМЗ) відноситься до тяжких і небезпечних для життя онкологічних патологій, і займає перше місце в структурі онкологічної захворюваності жінок у світі і різних країнах. Статистичні дані останніх років свідчать про зростання захворюваності та смертності від цього захворювання в різних країнах і в Україні. Рецидивний перебіг РМЗ, висока смертність, низька якість життя хворих, які перенесли лікування, зумовлюють необхідність постійно вдосконалювати діагностику та лікування (Тамм ТИ, 2020).

Молекулярно-біологічні типи РМЗ мають різні епідеміологічні фактори ризику (Phipps AI, 2011), різні природні історії і дають різну відповідь на системну і місцеву терапію (Phipps AI, 2011; Liedtke C, 2008; Dignam JJ, 2009).

Серед досліджень внеску мікрооточення в онкогенез, у сучасному розумінні, подвійна роль імунних клітин висвітлюється як баланс між анти- і пропухлинною активністю, який зумовлює подальшу долю пухлини (Gonzalez H., 2018).

Макрофаг (Мф) є ключовою клітиною, яка відповідає на метаболічні сигнали мікрооточення, на якій замикаються/переключаються метаболічні сигнали і імунна відповідь, що робить її роль вкрай важливою для кожного етапу онтогенезу (Nelson MC, 2020; Goede KE, 2020).

Асоційовані з пухлиною макрофаги (ПАМ) М2-типу домінують у пухлинах і продукують молекули, стимулюючи ріст пухлини, а зміна М2-типу на М1 може уповільнювати або припиняти цей ріст (Mills CD, 2016). При РМЗ виявлено змішаний цитокіновий профіль М1/М2 (Mohamed MM, 2014), що говорить про наявність у ній і функції М1, і М2 ПАМ. Імовірно, що існує спектр ПАМ, фенотип і функція яких залежить від типу пухлини та розташування всередині пухлини (Brady NJ, 2016).

Зв'язок ПАМ із злоякісним фенотипом та прогнозом РМЗ описано у ряді досліджень (Zhao X, 2017; Ruffell B, 2012; Tashireva LA, 2017; Komohara Y, 2017), також продемонстровано зв'язки ПАМ з проліферацією, диференціюванням, експресією естрогенових рецепторів (ER) і патогістологією (Sousa S, 2015). Але функціональний фенотип ПАМ обговорюється мало.

Отже, на сьогоднішній день відсутній систематичний підхід дослідження який би міг співвіднести молекулярно-біологічні підтипи РМЗ з проліферативними морфологічними особливостями пухлини, і представництвом різних ПАМ. Тому важливим завданням є дослідження співвідношення субпопуляцій Мф у мікросередовищі пухлин та їх метастазів при різних видах РМЗ для встановлення зв'язків з метастазуванням з метою прогнозу і вибору лікування, у відповідності до експресії ER, прогестеронових рецепторів (PR) та маркеру клітинної проліферації (Ki67).

Зв'язок роботи з науковими програмами. Дисертація є фрагментом науково-дослідної роботи Української медичної стоматологічної академії «Комплексне дослідження патогенетичної ролі субпопуляцій М1 та М2 макрофагів в розвитку хронічного обструктивного захворювання легень для

розробки та обґрунтування персоналізованої терапії з врахуванням маси тіла» (№ державної реєстрації 0117U005252).

Мета дослідження. Підвищення ефективності прогнозування перебігу та наслідків аденокарциноми молочної залози залежно від визначення M1 і M2 фенотипів пухлино-асоційованих макрофагів у мікросередовищі пухлин та їх метастазів.

Завдання дослідження:

1. Верифікувати діагноз, встановити молекулярно-біологічні підтипи аденокарциноми молочної залози.

2. Сформувати дві врівноважені групи пацієнтів з аденокарциномами молочної залози за верифікованим молекулярно-біологічним типом пухлини, TNM стадією пухлини та її G-ступенем, залежно від метастазування у регіонарні лімфатичні вузли.

3. Вивчити кількісні показники та морфологічні особливості CD68+ і CD163+ клітин у мікрооточенні пухлини в залежності від наявності або відсутності метастазів у регіонарні лімфатичні вузли.

4. Вивчити кількісні показники та морфологічні особливості CD68+ і CD163+ ПАМ у мікрооточенні пухлини відповідно до молекулярно-біологічних типів аденокарциноми молочної залози.

5. Встановити взаємозв'язки кількісних показників CD68+ і CD163+ ПАМ мікрооточення пухлини з післяопераційним прогнозом.

Об'єкт дослідження: внесок пухлино-асоційованих макрофагів в імунопатогенез РМЗ.

Предмет дослідження: M1 і M2 фенотипи пухлино-асоційованих макрофагів та молекулярно-біологічні типи РМЗ.

Методи дослідження: загальноклінічні (обстеження пацієнтів на аденокарциному молочної залози), патогістологічні (верифікація діагнозу РМЗ, встановлення стадії та наявності метастазів), імуногістохімічні (визначення M1 і M2 фенотипи пухлино-асоційованих макрофагів та молекулярно-біологічні типи РМЗ), статистичні.

Наукова новизна отриманих результатів. На підставі комплексних імуногістохімічних та патогістологічних досліджень розширено та доповнено знання щодо участі CD68+ та CD163+ макрофагів в імунопатогенезі РМЗ та метастазуванні у регіональні лімфовузли.

Отримано нові дані про вірогідне кількісне переважання CD68+ макрофагів незалежно від молекулярно-біологічного типу РМЗ та метастазування.

Вперше встановлено, що при люмінальному А типі кількість інфільтруючих CD68+ ПАМ достовірно перевищує кількість CD163+ ПАМ в первинних вогнищах та метастазах РМЗ, що асоційовано з менш агресивним перебігом захворювання.

Вперше показано, що при люмінальному В HER2- типі спостерігалось зниження кількості CD68+ ПАМ при метастазуванні та підвищення кількості CD163+ ПАМ в метастазах лімфатичних вузлів.

Вперше встановлено, що при люмінальному В HER2+ типі РМЗ відзначено вірогідне підвищення CD68+ ПАМ лише в метастазах лімфовузлів.

За результатами імуногістохімічного дослідження вперше встановлено, що при нелюмінальному HER2+ типі кількість CD68+ ПАМ в первинному вогнищі метастазуючого РМЗ порівняно з неметастазуючим раком підвищена у 2-8 разів. В первинному вогнищі метастазуючого раку кількість CD68+ ПАМ переважає кількість цих клітин в метастазах лімфовузлів в 1,6-5 разів. Такі зміни є характерними для CD68+ клітин, але не для CD163+ ПАМ.

Отримані нові дані, що потрійно негативний РМЗ характеризуються збільшенням CD163+ ПАМ в метастазах лімфовузлів в 1,5-3 рази порівняно з первинними вогнищами.

Доведено наявність кореляційної залежності між рівнем CD68+ і CD163+ ПАМ та молекулярно-біологічними типами РМЗ, G-ступенем, Ki-67, ER, PR.

Вперше показано, що поєднане використання маркерів CD68+ і CD163+ – є досить надійним методом імуногістохімічного дослідження щодо ПАМ-інфільтрації при РМЗ, який слугує певним морфологічним відображенням M1/M2-поляризованих макрофагів і може бути використано для прогнозування та тактики лікування.

Практичне значення отриманих результатів. У якості додаткової характеристики РМЗ рекомендовано визначення особливостей кількісних показників інфільтрації CD68+ та CD163+ ПАМ первинного вогнища РМЗ в залежності від молекулярно-біологічного типу та лімфатичного метастазування.

Визначення кількісних показників CD68+ над CD163+ПАМ в первинних вогнищах і в метастазах лімфовузлів при різному перебігу захворювання в залежності від молекулярно-біологічного підтипу РМЗ, вказує на відмінність сигналів стимуляції росту пухлини при кожному підтипі та вимагає індивідуального підходу до блокування цих сигналів (ER, PR, HER2).

Рекомендовано систему моніторингу рівня інфільтрації первинних вогнищ CD163+ПАМ, яка може корелювати із зниженням виживаності пацієнтів і використовуватися в подальшому для прогнозування.

Результати дисертаційного дослідження запроваджені в практику клінічних баз кафедри внутрішньої медицини № 3 з фтизіатрією (акт впровадження від 19.12.2019 р.), кафедри онкології та радіології з радіаційною медициною (акт впровадження від 9.09.2018 р.) Української медичної стоматологічної академії, а також у практику хірургічного відділення «Кременчуцького обласного онкологічного диспансеру Полтавської обласної ради» (акт впровадження: жовтень 2020 – листопад 2020 р.), хірургічного відділення «Полтавського обласного онкологічного диспансеру Полтавської обласної ради» (акт впровадження: жовтень 2020 – листопад 2020 р.), хірургічного відділення КНП «Мелітопольський онкологічний диспансер Запорізької обласної ради» (акт впровадження: вересень 2018 р. – листопад 2020 р.)

Особистий внесок здобувача. Дисертація є особистою науковою працею здобувача. Автор особисто виконав патентно-інформаційний пошук та всю клінічну частину роботи, а також провів аналіз клінічних, патогістологічних,

імуногістохімічних результатів досліджень, статистичний аналіз даних, сформулював основні положення роботи та висновки, оформив дисертаційну роботу. У виконанні фінішного змісту роботи участь автора є провідною. Мета і завдання дисертаційної роботи сформульовані разом з науковим керівником. У наукових працях, що опубліковані в співавторстві, внесок здобувача є вирішальним.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертації доповідалися та обговорювалися на Міжнародній науково-практичній конференції присвяченій 70-річчю від дня заснування Полтавського обласного клінічного онкологічного диспансеру Полтавської обласної ради (10-11 травня 2018 року, м. Полтава); at the International conference dedicated to the 20th anniversary of Ukrainian Society of Radiation Oncologists «Actual Questions of Radiation Oncology in Ukraine» (June 26-27, 2019, Poltava); XVII Міжнародній науковій конференції студентів, молодих вчених та фахівців «Актуальні питання сучасної медицини», присвячена 215-річчю від дня заснування медичного факультету Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна (1-2 жовтня 2020 року); XVIII Міжнародній науковій конференції студентів, молодих вчених та фахівців «Актуальні питання сучасної медицини», присвячена 25-річчю заснування кафедри загальної та клінічної патології медичного факультету Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна (22-23 квітня 2021 року).

Публікації. За результатами дисертаційної роботи опубліковано 5 наукових праць, у тому числі 4 статті – у провідних фахових вітчизняних та 1 стаття – у закордонному виданні, що входить до міжнародної наукометричної бази Scopus.

Структура та обсяг дисертації. Матеріали дисертації викладено українською мовою на 177 сторінках комп'ютерного тексту, з них 137 сторінок – основного тексту. Робота містить анотації, вступ, зміст, перелік скорочень, аналітичний огляд літератури, опис матеріалів і методів досліджень, розділ з 6 підрозділів результатів власних досліджень, розділ аналізу та узагальнення, висновки, список використаних джерел літератури (всього 263 джерел, із яких 15 викладено кирилицею, 248 – латиницею), додатки. Дисертаційна робота ілюстрована 34 рисунками і 15 таблицями.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Об'єкт та методи дослідження. Дослідження організоване як оригінальне наукове кроссекційне, з персоніфікованим підходом. Було опрацьовано 250 історій хвороби. Для поглибленого вивчення вибрано 90 пацієнток з верифікованим діагнозом РМЗ, які були розподілені на 2 групи (перша N0 група – 46 пацієнток, друга N1 група – 44 пацієнтки), по 5 підгруп у кожній та проведено імуногістохімічне дослідження 245 зразків мікропрепаратів. Пацієнток регулярно спостерігали під час візитів до клініки чи по телефону, протягом 58 місяців, або до часу смерті. Загальну виживаність використовували для прогностичного аналізу.

Критерії включення у дослідження:

1) верифікований діагноз: операбельна аденокарцинома молочної залози T1-2 N0-2 M0 (I-IIIА стадії) без неоад'ювантного курсу хіміотерапії і без променевої терапії;

2) підтверджений злоякісний процес за даними патоморфологічного дослідження;

3) визначення молекулярно-біологічного підтипу за даними імуногістохімічного дослідження на ER, PR, HER2, Ki67.

Критерії виключення:

1) наявність відділених метастазів в інші тканини або органи, окрім іпсилатеральних лімфовузлів;

2) наявність важких, неконтрольованих (декомпенсованих) захворювань внутрішніх органів або нервово-психічні розлади;

3) наявність інших станів, що визначали нездатність пацієнтки розуміти природу та можливі наслідки дослідження.

Діагноз «аденокарцинома молочної залози» або РМЗ встановлювали за клінічними результатами обстеження, та верифікували за результатами морфологічних критерії біопсійного інтраопераційного матеріалу.

Оцінку патогістологічного типу РМЗ проводили відповідно до класифікації ВООЗ, 2012 р. та AJCC, 2017 р.

Після встановлення діагнозу всім пацієнткам проведене оперативне втручання – радикальна мастектомія, після чого проводили патогістологічне дослідження та імуногістохімічне дослідження зразків видалених РМЗ та іпсилатеральних лімфовузлів.

Для всіх учасників дослідження реєстрували вік та клініко-лабораторні показники: молекулярно-біологічний тип пухлини, а також: G ступінь, наявність/відсутність метастазів в іпсилатеральні лімфовузли.

Для розподілу пацієток на групи використано метод стратифікованої рандомізації: підгрупи врівноважені за молекулярно-біологічними типами РМЗ.

Перша N0 група дослідження була представлена пацієнтками з РМЗ без метастазів в іпсилатеральні пахвові лімфовузли (n=46), друга N1 група дослідження – пацієнтками з РМЗ з метастазами тільки в іпсилатеральні пахвові лімфовузли (n=44).

Кожна група включала 5 підгруп:

люмінальний А-підгрупа першої N0 групи, люмінальний А-підгрупа другої N1 групи;

люмінальний В HER2– - підгрупа першої N0 групи, люмінальним В HER2– -підгрупа другої N1 групи;

люмінальний В HER2+ - підгрупа першої N0 групи, люмінальний В HER2+ -підгрупа другої N1 групи;

нелюмінальний HER2+ - підгрупа першої N0 групи, нелюмінальний HER2+ -підгрупа другої N1 групи;

та потрійний негативний РМЗ - підгрупа першої N0 групи, потрійний негативний РМЗ - підгрупа другої N1 групи.

Відповідно до групи та підгруп молекулярно-біологічного типу РМЗ вивчали кількісні характеристики, особливості локалізації, співлокалізації,

морфології CD68+ і CD163+ клітин. Зразки РМЗ характеризували за патогістологічними рисами/особливостями. Виконували підрахунок CD68+ і CD163+ клітин у метастазах для другої групи.

Кореляційні зв'язки між кількісними показниками CD68+, CD163+ ПАМ, CD68+/CD163+ пропорцією ПАМ та ІГХ характеристиками РМЗ і G-ступенем проводили на повному масиві учасниць, групи N0+ і N1, а також для окремих підгруп. Оцінку виживаності в залежності від щільності інфільтрації ПАМ проводили на повній виборці пацієнток, але розподіливши їх на 2 підгрупи, за умовно високою (≥ 15 клітин на поле зору зб. $\times 280$) та низькою (< 15) щільністю інфільтрації первинного вогнища РМЗ CD68+ клітинами, та згідно умовного поділу на дві підгрупи: помірний рівень інфільтрації CD163+ клітинами: > 3 клітин на поле зору зб. $\times 280$, низький рівень – 0-3.

Обраний дизайн дослідження у малих вузькоспеціалізованих групах пацієнтів враховує індивідуальні результати досліджень, відповідає сучасному прогресивному принципу персоналізованої медицини, і дозволяє досягти поставленої мети дисертації.

Відбір біоптатів. Маніпуляції з операційним матеріалом проводилися з урахуванням тривалості холодної і теплої ішемії (тепла ішемія визначається як час від моменту зупинки кровопостачання досліджуваної тканини до видалення тканини; холодна ішемія – час від видалення зразка до початку процесу фіксації матеріалу). Після маркування країв резекції і виконаних надрізів товщиною 5-10 мм, отриманий операційний/біопсійний матеріал фіксували у 10% розчині нейтрального забуференого формаліну при кімнатній температурі протягом не більше 20-30 хв. після видалення пухлини. Обсяг фіксатора перевищував обсяг фіксованого матеріалу в 10 разів, після чого проводився контроль якості фіксатора (колір фіксатора не змінювався). Дотримувалися оптимальної тривалості фіксації матеріалу для визначення рівня ER, PR і Ki67 та HER2, яка становить для операційного матеріалу – 18-24 год., для біопсії – 6-8 год.

Визначення гістопатологічних ознак, молекулярно-біологічного типу та G-ступеня РМЗ. Гістологічну проводку фіксованого біоматеріалу здійснювали у автоматизованих гістопроекторах (Milestone LOGOS Microwave Hybrid Tissue Processor, Milestone, Italy). Після проводки проводили заливку матеріалу у парафін з виготовленням парафінових блоків за допомогою станцій заливки та виготовлення парафінових блоків Thermo Scientific HistoStar (Thermo Fisher Scientific, USA).

Гістологічні зрізи товщиною 4 мкм виготовляли на напівавтоматизованому ротаційному мікротомі Thermo Scientific HM 340E.

Препарати забарвлювали гематоксиліном та еозином з використанням автоматизованого коверстейнера Dako CoverStainer (Agilent, USA).

Оцінку гістологічного типу РМЗ проводили відповідно до класифікації BOO3, 2012 р. та до 8-го перегляду AJCC, 2017 р. за допомогою мікроскопу Nikon Eclipse E200 (Nikon Corporation, Japan).

Стадію пухлини визначали відповідно до Міжнародної класифікації злоякісних пухлин TNM 7-го видання (2009 р.), і до наказу МОЗ України № 554

від 17.09.2007 року «Про затвердження протоколів надання медичної допомоги за спеціальністю «Онкологія», а також за клінічними стадіями ВООЗ.

Для визначення молекулярного типу РМЗ проводили імуногістохімічне дослідження з визначенням експресії наступних маркерів:

- 1) ER – естроген-рецептор альфа (DAKO, клон ER1);
- 2) PR – прогестерон-рецептор (DAKO, клон PgR 636);
- 3) HER2/neu – онкопротеїн c-erbB-2 (DAKO, поліклональні);
- 4) Ki-67 – маркер проліферації (DAKO, клон MIB-1).

При ІГХ використовували протоколи відповідно до інструкцій виробника. Підрахунок здійснювався з використанням автоматизованих аналізаторів зображення, що знижує варіабельність результатів оцінки. Контролем слугувала нормальна тканина молочної залози. Позитивним результатом ІГХ-дослідження експресії ER та PR вважався рівень $\geq 1\%$; негативним – результат, коли рівень експресії становить менше 1%.

Для оцінки індексу Ki67 враховували ядерне фарбування, без урахування його інтенсивності, а також тип експресії маркера (перінуклеолярний, нуклеоплазменний, періхромосомний). Підрахунок включав в себе не менше 1000 пухлинних клітин в 3 полях зору при збільшенні $\times 400$. У разі гетерогенності пухлини обиралися ділянки з найбільшим забарвленням.

Оцінка та інтерпретація результатів ІГХ на HER2 проводилися на підставі наступних умов. HER2-статус оцінювали тільки в інвазивному компоненті пухлини. Рак *in situ* оцінці не підлягав, оскільки подібні структури часто відрізняються різко вираженою позитивною реакцією. Оцінювали тільки фарбування мембрани клітин, цитоплазматичне забарвлення оцінці не підлягало. Проводилось обов'язкове порівняння інтенсивності забарвлення пухлинних і нормальних структур. При яскраво вираженій реакції в нормальних структурах, HER2-статус не оцінювався. Контролем для кожного циклу ІГХ була нормальна тканина молочної залози.

Оцінку експресії проводили відповідно до протоколу оцінки біомаркерів у зразках, отриманих від пацієнтів з раком грудної залози Американського Коледжу Патологів (CAP, USA) з урахуванням вимог чек-листу акредитаційної програми CAP 2018 та рекомендацій CAP/ASCO щодо оцінки HER2.

Результати ІГХ-реакції оцінюються за допомогою бальної шкали оцінки 0, 1+, 2+, 3+. Оцінка проводилася з використанням світлового мікроскопа при збільшенні об'єктива 10x і лише в прикордонних випадках 1+/2+ – об'єктива 20x. Пухлини, оцінені як ІГХ 0 або ІГХ 1+ вважаються HER2-негативними, пухлини оцінені як ІГХ 3+ вважаються HER2- позитивними, пухлини, оцінені як ІГХ 2+ мають невизначений HER2-статус і вимагають застосування додаткових методів дослідження, таких як гібридизація *in situ*. В даний час в якості прикордонного значення для оцінки ІГХ 3+ прийнято однорідне виражене мембранне забарвлення більше 10% клітин інвазивного компоненту пухлини. Ці дані відповідають клінічному трактуванню або значенню результатів ІГХ при РМЗ. Гістологічний ступінь G РМЗ базується на оцінці утворення каналців/проток, розмірі ядер і їх плеоморфізмі та мітотичній

швидкості. Система балів застосовується, коли кожній ознаці привласнюється оцінка від 1 до 3.

Формування тубул: оцінка 1 > 75% пухлини складається з тубулярних структур; оцінка 2 – 10-75% пухлини складається з тубулярних структур; оцінка 3 < 10% пухлини має тубули.

Розмір ядер: оцінка 1 – маленькі однорідні ядра, схожі на ядра нормального протокового епітелію; оцінка 2 – ядра середнього розміру; оцінка 3 – більше ніж удвічі перевищують розмір нормальних ядер.

Кількість мітозів: оцінка 1 – 0-7 мітозів на 10 полів зору великого збільшення; оцінка 2 – 8-14 мітозів на 10 полів зору великого збільшення; оцінка 3 – більше 15 мітозів.

Підсумкова гістологічна оцінка оцінюється із суми всіх трьох. Бали від 3 до 5 = добре диференційовані (I ступінь); оцінка 6 або 7 = помірно диференційована (II ступінь); і оцінка 8 або 9 = погано диференційована (III ступінь). Ядерні особливості оцінюються в районі з найбільшим плеоморфізмом. Ядра пухлини порівнюються з ядрами нормальних клітин протокового епітелію в сусідній тканині молочної залози.

Імуногістохімічне визначення та оцінка CD68+ та CD163+ клітин. Імуногістохімію проводили за допомогою стрептавідин-пероксидазного методу. Парафінові зрізи товщиною 4-5 мкм, отримані за стандартною технікою автоматизованого циклу патолого-анатомічної лабораторії, депарафінували шляхом занурення у три послідовних посудини з ксилолом на 5 хв., потім у три посудини зі 100° спиртом, по 2 хвилини, двічі у 96° спирті також по 2 хв., у 70° спирт – на 2 хв. і дистильовану воду – також на 2 хв.

Наступним кроком відновлювали антигени у цитратному буфері (pH=6,0) у мікроволновій печі (при потужності ≈ 600 Вт, 3 цикли по 7 хв. з перервою 1 хв.), охолоджували 20 хв., відмивали у дистильованій воді двічі по 1 хв., та фосфатно-сольовому буфері (ФСБ, pH=7,2-7,4) – 2 хв.

Далі блокували ендогенну пероксидазу реактивом з набору PolyVue HRP/DAB Detection System (For Mouse & Rabbit Primary Antibodies, Diagnostic BioSystems, USA), наносячи 2 краплини на зріз – 5 хв., та відмивали у ФСБ, у трьох послідовних ємностях по 1 хв.

Після чого на парні зрізи наносили мишачі моноклональні антитіла анти-CD68 готові до використання (клон PG-M1, REF PD M065-S, Diagnostic BioSystems, USA) і анти-CD163 (клон 10D6, REF Mob460-01), у розведенні 1:100 у буфері для розведення антитіл (Antibody Diluent, Dako, USA), та інкубували при температурі 4°C протягом ночі.

Наступним кроком препарати відмивали у ФСБ у трьох послідовних посудинах по 1 хв., та обробляли зрізи 10 хв. нанесеною краплиною реагенту Polymer penetration Enhancer з набору Mouse/Rabbit PolyVue™ HRP/DAB Detection System (Diagnostic BioSystems, USA) у вологій камері при кімнатній температурі. І знову відмивали у ФСБ тричі по 1 хв.

Далі на зрізи наносили реактив PolyVue HRP Label anti-mouse (Diagnostic BioSystems, USA) на 10 хв., помістивши їх у вологу камеру при кімнатній температурі. І відмивали у ФСБ тричі по 1 хв.

Наступний етап був нанесення проявочного субстрату-хромогену на основі діамінобензидину – DAB stable/Plus, приготованого *ex tempore*, також з набору реагентів Mouse/Rabbit PolyVue™ HRP/DAB Detection System, витримували 10 хвилин у вологій камері у темряві. Відмивали препарати у трьох послідовних посудинах з дистильованою водою по 1 хв.

Для контрастування препаратів, їх дозобарвлювали гематоксиліном Майєра – експозиція 2 хв., промивали дистильованою водою, проявляли у ФСБ 3 хв. і піддавали дегідратації, витримуючи по 2 хвилини у послідовних ємностях з 40° спиртом, 70° спиртом, 96° спиртом і двох ємностях з ксиолом. Після чого заключали під покривне скло у кедровий бальзам для оцінки під мікроскопом.

Буфер Antibody Diluent замість первинних антитіл використовували як негативний контроль, тканини лімфовузлів – як позитивний. Оцінку ІГХ забарвлення проводили шляхом підрахунку CD68+ ПАМ і CD163+ M2-подібних ПАМ під світловим мікроскопом (Біолам, ЛОМО, Росія: об'єктив $\times 40$, окуляр $\times 7$) у 5-17-ти послідовних полях зору кожного зрізу (в залежності від площі зразку), у межах пухлини (а саме, в пухлинних гніздах/кластерах та у пухлинній і навколо пухлинній/перитуморальній стромі).

У підрахунок включали імунопозитивні клітини з морфологією макрофагів. Мікрофотографії отримували за допомогою мікроскопу Leica DM500, Leica, Германия, зб. $\times 280$, 400).

Був обраний спосіб підрахунку імунопозитивних клітин – на всьому полі зору максимального збільшення (аналогічно до способу підрахунку кількості мітозів пухлини для визначення її G-ступеня).

Статистичний аналіз. Статистичний аналіз проводили за допомогою програмного забезпечення GraphPad Prism 5. При порівнянні між групами використано непараметричний метод Манна-Уїтні. При порівнянні кількісних показників макрофагів між первинним вогнищем і метастазом використано парний метод Вілкоксона для залежних перемінних.

Для встановлення зв'язків між кількісними показниками CD68+, CD163+ макрофагів та клінічними трактовками ER, PR, Ki67, G-ступенем, а також для перевірки можливих кореляційних відносин між кількісними характеристиками макрофагів у первинній пухлині та у відповідному метастазі, використовували статистичний метод непараметричної кореляції Спірмена, а також параметричної кореляції Пірсона й лінійну регресію (при нормальному розподілі).

Для оцінки співвідношення CD68+/CD163+ використано Т-тести для залежних перемінних та перевірено кореляції між кількісними показниками. Для емпіричної оцінки змін кількісних показників у групах використано серію комп'ютерних симуляцій у якості моделювання, які забезпечують наближення до справжнього розподілу, що лежить в основі статистики. Використано стандартне відхилення та значення середнього, отримане при обробці вихідних даних, стандартну похибку визначали, приймаючи розподіл Гауса ($n=100$).

При оцінці виживаності використано статистичний метод порівняння пропорцій χ^2 -теста, або точний критерій Фішера (для умов коли мінімальне

значення у пропорціях не досягає 5). Загальну виживаність оцінювали за допомогою статистичного методу Каплан-Майєра.

Значення $p \leq 0,05$ вважали статистично значущими для всіх аналізів.

Результати дослідження. Згідно з дизайном, виявлені закономірності відносяться до суто пухлинного процесу РМЗ та не мають впливу попереднього лікування, оскільки його розпочинали з оперативного втручання.

Якісна оцінка ПАМ виявила типову імунореактивність CD68+ та CD163+ по контуру цитоплазми або по всій клітині, рівномірно та/або у вигляді коричневої крапчастості. Форми клітин були округлими гілчастими та видовженими. Типова локалізація CD68+ ПАМ охарактеризована як регулярна у стромі пухлини, але відмічалися відділи пухлинних кластерів без ПАМ.

CD163+ ПАМ співлокалізувалися з CD68+ у стромі, та в окремих гніздах, у т.ч. некротичних, у меншій кількості.

Локалізація ПАМ та їх щільність взаємопов'язані з патоморфологією РМЗ, яка була дуже різноманітна, навіть у межах клінічно розсортованих вузьких типів. Не зважаючи на певну спільність патоморфологічних рис, таких як десмопластична реакція стромі, фіброзна, фіброзно-жирова строма, певний рівень лімфоїдної інфільтрації, осередки некрозів, мікрокальцифікати, – займані ними площі дуже різняться.

Порівняння кількісних показників CD68+, CD163+ ПАМ первинного РМЗ між двома групами дослідження, N0 і N1, показав збільшення кількісних показників CD68+ ПАМ за умов метастазів. Кількісні показники CD68+ ПАМ другої групи характеризувалися особливо великим розкидом варіації, що відображає високу імовірність екстремальних значень (рис 1).

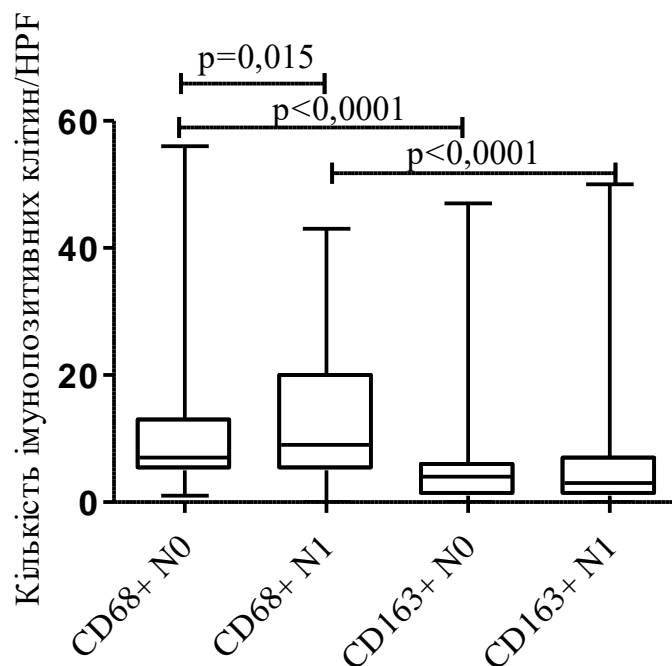


Рис. 1. Порівняння кількісних показників CD68+, CD163+ клітин первинного РМЗ двох груп дослідження: N0 і N1. HPF – поле зору зб.×280

Кореляційна аналіз повної вибірки показав прямі достовірні кореляційні взаємозв'язки між кількістю CD68+ клітин і Ki67, і зворотні кореляційні зв'язки між кількостями CD68+, CD163+ клітин та ER/PR.

При люмінальних РМЗ кореляційний аналіз виявив зворотний достовірний зв'язок між середніми кількостями CD68+ клітин (але не CD163+) і G-ступенем пухлин ($p=0,046$). Порівняння між кількісними показниками CD68+, і CD163+ ПАМ на рівні всієї вибірки люмінальних типів, в залежності від N0 ($n=30$) і N1 ($n=28$), не відрізнялися.

В межах кожного окремого типу люмінальних РМЗ порівняння показало наступні результати.

При люмінальному А РМЗ достовірністю характеризувалося співвідношення CD68+/CD163+ ПАМ на користь перших ($p=0,0395$, $p=0,008$), не залежно від метастазування, і, аналогічно, в метастазах лімфатичних вузлів ($p=0,0344$) (Рис. 2).

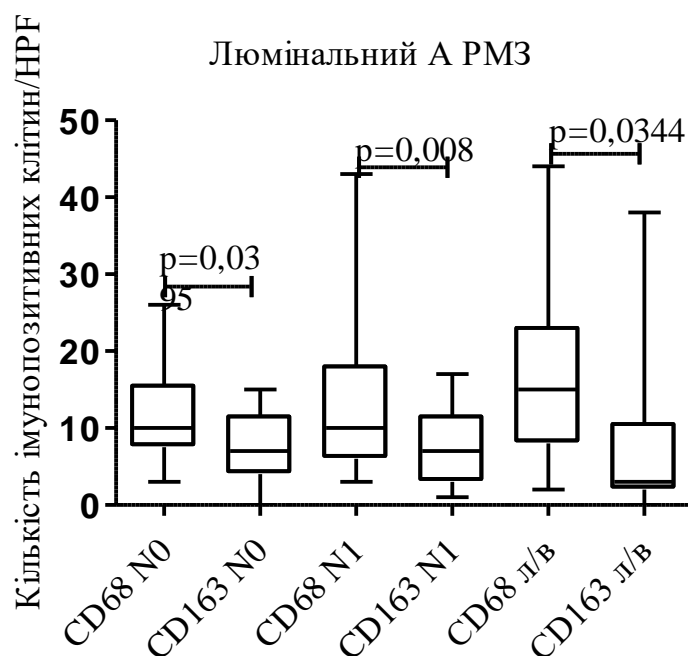


Рис. 2. Порівняння кількісних показників CD68+, CD163+ ПАМ люмінального А РМЗ. Методами Манна-Уїтні (для незалежних перемінних) та Вілкоксона (для залежних перемінних); N0 – група без метастазів, N1 – з метастазами; л/в – лімфовузли, уражені метастазами; HPF – поле зору зб.×280.

При люмінальному В HER2– (негативному) РМЗ в метастазуючих зразках кількісні показники CD68+ та CD163+ ПАМ знижувалися, порівняно із зразками первинного вогнища не метастазуючого РМЗ ($p=0,0294$, $p=0,0079$), а CD163+ ПАМ були представлені у лімфатичних метастазах на вищому рівні, порівняно з первинними вогнищами обох груп N0 і N1. ($p=0,0014$) (Рис 3).

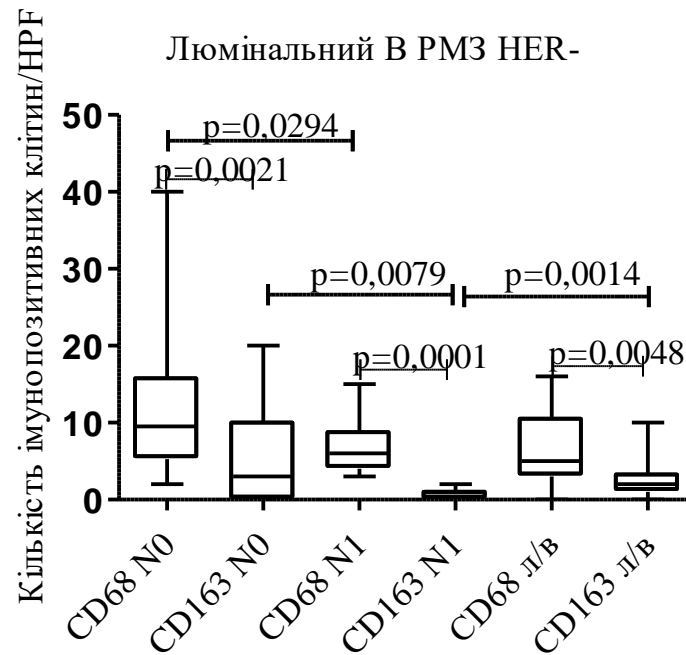


Рис. 3. Порівняння кількісних показників CD68+, CD163+ ПАМ люмінального В HER2– РМЗ.

При люмінальному В HER2+ РМЗ підтверджена перевага CD68+ над CD163+ ПАМ в межах метастазів ($p=0,0001$).

Змін між кількісними показниками ПАМ в первинних вогнищах та метастазах не встановлено. (Рис. 4).

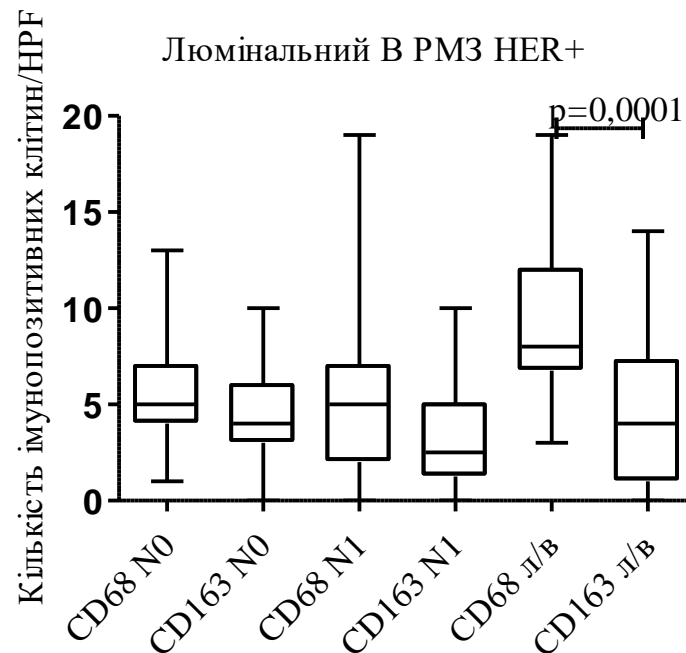


Рис. 4. Порівняння кількісних показників CD68+, CD163+ ПАМ люмінального В HER2+ РМЗ.

Таким чином, в залежності від конкретного типу люмінальних РМЗ, і від статусу метастазування, ПАМ мали різне представництво.

При нелюмінальному HER2+ РМЗ встановлено достовірне збільшення кількості CD68+ клітин у другій, N1, групі ($p < 0,0001$, тест Манна-Уїтні) та достовірне зменшення кількості CD68+ клітин у метастазах, порівняно з первинним РМЗ ($p < 0,0001$, тест Вілкоксона). Кількість CD163+ клітин між первинним вогнищем і метастазами не відрізнялися. (Рис. 5).

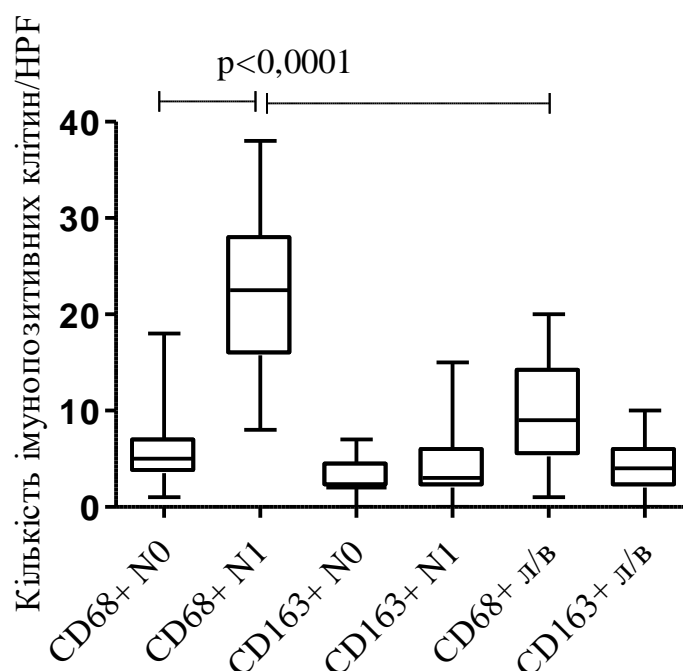


Рис. 5. Порівняння кількісних показників CD68+, CD163+ ПАМ нелюмінального HER2+ РМЗ.

Отже, визначна знахідка при порівнянні нелюмінальних типів РМЗ N0 та N1 груп – це підвищення представництва CD68+ клітин за умов метастазування.

При потрійному негативному РМЗ встановлено достовірне збільшення кількості CD68+ та CD163+ ПАМ в первинному РМЗ у другій N1 групі з метастазами, зменшення CD68+ клітин у метастазах в лімфатичних вузлах, порівняно з первинним вогнищем, та зворотне кореляційне відношення помірної сили між CD163+ клітинами в первинних вогнищах і метастазах (кореляція Спірмена: $p = 0,0024$, $r = -0,627$) (Рис. 6).

CD68+ ПАМ різко нерівномірно розподілялися на препаратах всіх зразків, утворювали власні осередки у стромі, гніздах, та ділянках некрозу, де набували незвичайної зливної та/або вакуолізованої форми. CD163+ ПАМ на препаратах було помітно менше ніж CD68+. Відзначена їх регулярна локалізація у фіброзній стромі, навколо гнізд серед лімфоїдного інфільтрату.

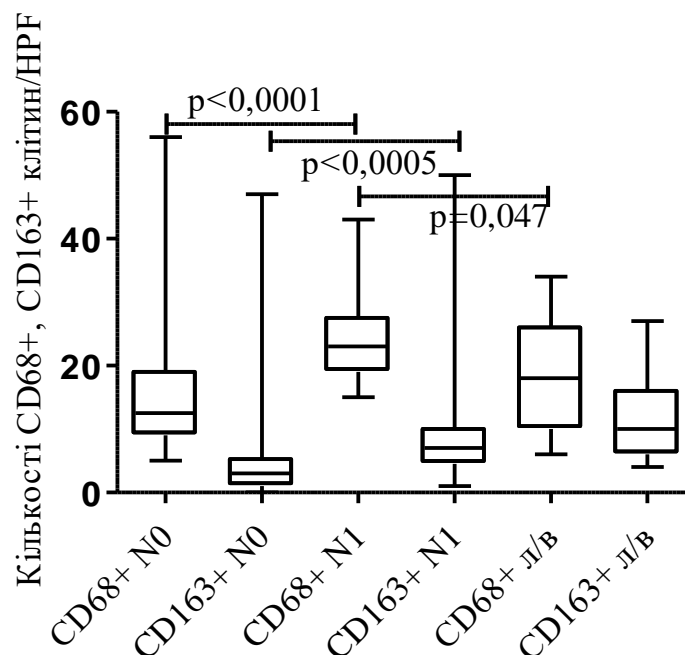


Рис. 6. Порівняння кількісних показників CD68+, CD163+ ПАМ при потрійному негативному РМЗ.

Стосовно морфології метастазів РМЗ, необхідно відмітити, що пухлинні клітини в них могли відрізнятися від первинних вогнищ, або бути схожими. І відсутність, або поява корелятивних відношень між кількісними показниками ПАМ первинних вогнищ й метастазів (як при люмінальних, нелюмінальному типах, або ПН РМЗ) може означати, що лімфатичне метастазування не є пасивним переносом клітин, а супроводжується численними змінами, які розпізнаються макрофагами, і у яких ці клітини беруть участь.

При перевірці кореляції щільності інфільтрації первинного РМЗ CD68+ і CD163+ ПАМ з післяопераційною виживаністю у врівноважених групах показано зворотний, але статистично не достовірний зв'язок. Серед пояснень: великий індивідуальний розмах кількісних показників CD68+ і CD163+ ПАМ, зв'язок з молекулярно-біологічним типом пухлини, продемонстрованим вище, та з їх статусом лімфатичного метастазування.

ВИСНОВКИ

У дисертації наведене нове вирішення актуального наукового завдання про залежність кількісних показників інфільтрації CD68+ та CD163+ ПАМ первинного вогнища РМЗ та метастазів лімфовузлів від його молекулярно-біологічного типу.

1. Кількісні показники CD68+ ПАМ переважали над CD163+ ПАМ ($p=0,015$) в обох N0 і N1, врівноважених за молекулярно-біологічними типами РМЗ, групах дослідження. У групі з метастазами кількісні показники CD68+ ПАМ підвищувалися ($p<0,0001$), але мали великий розмах індивідуальних значень. Разом із кореляцією між CD68+, CD163+ ПАМ та ER/PR ($p=0,02$ та $p=0,009$, відповідно), а також між кількістю CD68+ ПАМ і Ki67 ($p=0,04$) (що

встановлена на повній вибірці), ці знахідки дозволяють прослідити взаємозв'язки між ПАМ та типом РМЗ.

2. При люмінальному А РМЗ (ER+, PR+, HER2-, Ki67≤15%) збільшення кількісних показників CD68+ ПАМ над CD163+ ПАМ в 2-3 рази ($p=0,0395$, $p=0,008$), в первинних вогнищах груп N0 і N1, а також в метастазах лімфатичних вузлів, обумовлює менш агресивний перебіг, порівняно з іншими типами раку РМЗ, а також високу ступінь диференціації пухлини, та потребує ендокринної терапії для блокування рецепторів ER і PR.

3. При люмінальному В HER2+ РМЗ (ER+, PR+, HER2+, Ki67- будь який) відмічено вірогідне підвищення CD68+ ПАМ лише в метастазах лімфовузлів.

4. При люмінальному В HER2- РМЗ (ER+, PR+, HER2-, Ki67>15%) зниження кількості CD68+ ПАМ ($p=0,0294$) в первинному вогнищі групи N1 і високі показники CD 163+ ПАМ в метастазах лімфатичних вузлів свідчить про інфільтрацію CD 163+ клітинами метастазів лімфатичних вузлів та про підвищений показник Ki-67, що потребує проведення не тільки ендокринної терапії (враховуючі позитивні рецептори на ER, PR), але і поліхіміотерапії для пригнічення проліферації.

5. При нелюмінальному HER2+ РМЗ (ER-, PR-, HER2+, Ki67 – будь який) виявлене достовірне збільшення кількості CD68+ ПАМ ($p<0,0001$) порівняно з CD163+ клітинами в 1.5-4 рази в первинних вогнищах групи N0 і N1, а також в метастазах лімфатичних вузлів, не знижує агресивність пухлини, що вимагає проведення поліхіміотерапії для блокування сигналу через HER 2.

6. При потрійному негативному РМЗ (ER-, PR-, HER2-, Ki67 – будь який) не дивлячись на переважання CD68+ ПАМ над CD163+ ПАМ в первинних вогнищах обох груп, а також в метастазах лімфатичних вузлів 1.5-4 рази, збільшення кількісних показників CD163+ ПАМ в метастазах лімфатичних вузлів порівняно з первинними вогнищами в 1,5-3,0 рази, вказує на переважання M2 макрофагів, що сприяють метастазуванню і вимагає проведення тільки хіміотерапії через відсутність (ER, PR, HER2) інших сигналів стимуляції росту пухлини.

7. Відносно вищий рівень інфільтрації первинних вогнищ РМЗ CD163+ ПАМ корелював із зниженням виживаності (81%) для повної вибірки пацієнток.

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. У якості додаткової характеристики РМЗ рекомендовано визначення особливостей кількісних показників інфільтрації CD68+ та CD163+ ПАМ первинного вогнища РМЗ в великих групах пацієнтів для подальшого впровадження в клінічну імунологію та онкоімунологію.

2. Визначення кількісних показників CD68+ над CD163+ПАМ в первинних вогнищах і в метастазах лімфовузлів при різному перебігу захворювання в залежності від молекулярно-біологічного підтипу РМЗ, можливо використовувати у якості додаткових характеристик первинних вогнищ та метастазів РМЗ.

3. Рекомендовано систему моніторингу рівня інфільтрації первинних вогнищ CD163+ПAM, яка може корелювати із зниженням виживаності пацієнтів і використовуватися в подальшому для прогнозу.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації

Статті у наукових фахових виданнях України:

1. Айкян А. З., Шинкевич В. І., Кайдашев І. П. Характеристика інфільтрації CD68⁺ та CD163⁺ макрофагами первинного вогнища та метастатичних уражень регіонарних лімфовузлів при люмінальних інвазивних карциномах грудної залози в залежності від їх імунофенотипу. *Світ медицини та біології*. 2018. Т. 4(66). С. 15–22. doi: 10.26724/2079-8334-2018-4-66-15-22. (Участь здобувача полягає у проведенні клінічних досліджень, заборі матеріалу для подальших лабораторних досліджень, аналізі отриманих даних, написанні статті).

2. Айкян А. З., Кайдашев І. П. Кількісна характеристика CD68⁺ та CD163⁺ макрофагів в первинному вогнищі та в метастатичних ураженнях регіонарних лімфовузлів при потрійно-негативній інвазивній карциномі грудної залози. *Вісн. проблем біології і медицини*. 2018. Т. 2(147). С. 313–319. doi: 10.29254/2077-4214-2018-4-2-147-313-319. (Участь здобувача полягає у проведенні клінічних досліджень, заборі матеріалу для подальших лабораторних досліджень, аналізі отриманих даних, написанні статті).

3. Aikian A. Z., Shynkevych V. I., Kaidashev I. P. Analysis of association between the density of infiltration in primary carcinoma of the mammary gland by tumor-associated macrophages and postoperative prognosis. *The Medical and ecological problems*. 2019. V. 23(1-2). P. 3–7. URL : <https://doi.org/10.31718/mep.2019.23.1-2.01> (date of the view: 10.06.2020). (Участь здобувача полягає у проведенні клінічних досліджень, узагальнення отриманих результатів, підготовка тексту статті).

4. Aikian A. Z., Shynkevych V. I., Kaidashev I. P. Immunological features of macrophages associated with metastasis of primary breast carcinoma into regional lymph nodes. *Bulletin of problems in biology and medicine*. 2020. V. 3(157). P. 269–274. doi: 10.29254/2077-4214-2020-3-157-269-274. (Участь здобувача полягає у проведенні клінічних досліджень, заборі матеріалу для подальших лабораторних досліджень, аналізі отриманих даних, написанні статті).

Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації у журналах, що входять до міжнародної наукометричної бази Scopus.

5. Aikian A. Z., Shynkevych V. I., Kaidashev I. P. Quantitative assessment of CD68⁺ AND CD163⁺ macrophages in the primary focus and metastatic lesions of regional lymph nodes in non-luminal her2-positive invasive breast carcinoma. *Wiadomosci Lekarskie* (Poland). 2019. V. 72(10). P. 1861–1865. (Участь здобувача полягає у проведенні клінічних досліджень, заборі матеріалу для подальших лабораторних досліджень, аналізі отриманих даних, написанні статті).

АНОТАЦІЯ

Айкян А. З. Роль M1 і M2 фенотипів макрофагів у імунопатогенезі аденокарциноми молочної залози при наявності або відсутності метастазів у регіонарних лімфатичних вузлах. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.03.08 - імунологія та алергологія. – Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, 2021.

При різних типах люмінальних РМЗ, в залежності від метастазування у лімфовузли, ПАМ можуть мати різне представництво. Зниження кількості CD68+ та CD163+ ПАМ ($p=0,0294$, $p=0,0079$) при метастазуванні люмінального В HER2- характеризує зв'язок між молекулярно-біологічним типом РМЗ та лімфатичним метастазуванням.

При нелюмінальному HER2+ РМЗ з метастазуванням достовірно збільшення кількості CD68+ ПАМ ($p<0,0001$), але не CD163+ клітин, може відображати наростання активності саме M1-типу ПАМ і їх сприяння метастазуванню.

При метастазуючому ПН РМЗ встановлено збільшення кількості CD68+ ПАМ ($p<0,0001$) та CD163+ ПАМ ($p<0,0005$), що підтверджує роль ПАМ, зокрема їх підрозділу – M2-подібних макрофагів (як мінімум за рахунок подвійно позитивної (CD68+ CD163+) частини ПАМ), як факторів, що сприяють метастазуванню.

Ключові слова: M1 M2 макрофаги, пухлинно-асоційовані макрофаги, імуногістохімічне дослідження, CD68, CD163, ER, PR, HER2, молекулярно-біологічний тип раку молочної залози.

ABSTRACT

Aikian A. Z. The role of M1 and M2 macrophage phenotypes in the immunopathogenesis of breast adenocarcinoma in the presence or absence of metastases in regional lymph nodes. – Qualification research work on the manuscript basis.

Thesis for a Candidate Degree in Medical Sciences, Speciality 14.03.08 – immunology and allergology. – V. N. Karazin Kharkiv National University, 2021.

The dissertation presents a new solution and theoretical generalization of the scientific problem, which consists in the established relationships between molecular biological types of breast adenocarcinoma, or breast cancer (BC), their individual pathomorphological features and metastasis to regional lymph nodes, and the representation therein of CD68+ tumor-associated macrophages (TAMs) and CD163+ TAMs to assess their prognostic and immunopathogenetic role.

The analysis of relationships between the infiltration levels of primary breast cancer by CD68+ and CD163+ TAMs with the postoperative prognosis, conducted on a complete sample, demonstrated a survival rate of 89% at high infiltration levels of CD68+ TAMs, and 83% at low, the difference was not significant; cumulative mortality in the subgroups did not reach a reliable difference. In addition, survival was 81% with moderate infiltration of CD163+ TAMs and 91% with low infiltration.

When compared, this fact does not reach statistical reliability and requires further observations for the conclusion, but in principle coincides with the concept that the relatively higher infiltration of the primary focus by M2-like MPh has a negative prognosis.

In contrast to luminal types of breast cancer (which in metastasis were characterized by individually relatively reduced average amounts of CD163+ TAMs: type A, individually relatively increased average amount of CD163+ TAMs: type B HER2+, and a significant decrease in CD68+ and CD163+ TAMs: type B and HER– in contrast to non-luminal HER+ breast cancer, which increased the number of CD68+ TAMs during metastasizing, $p < 0.0001$, triple-negative BC during lymphatic metastasizing is characterized by an increase in CD68+ and CD163+ TAMs ($p < 0.0001$, $p < 0.0005$), which confirms the dependence of TAM corresponding phenotypes (and, accordingly, the functional types M1 and M2) and the molecular biological type of breast cancer. Thus, it was demonstrated for the first time that different quantitative changes of CD68+ and CD163+ TAMs of the primary breast cancer accompany tumors in their metastases to regional lymph nodes, depending on the molecular biological type of breast cancer, using the approach of studies in stratified randomized and highly specialized research groups.

The tumor potential of CD68+ and CD163+ TAMs was confirmed, according to a progressive study of breast cancer.

The connection of the molecular and biological type of breast cancer, its separate pathohistological features with the quantitative indicators of CD68+ and CD163+ TAMs has been confirmed. The typical localization of TAMs, which is interrelated with the pathohistology of the specimens, was confirmed: the typical localization of CD68+ TAMs is tumor stroma, some tumor clusters, but not all of them, and the foci of necrosis. Co-localization of CD163+ TAMs is most clear - in the stroma, in other areas – at lower levels.

The heterogeneity of the primary focus of breast cancer and lymph node metastases and differences in the quantitative representations of CD68+ and CD163+ TAMs was confirmed with no significant correlations between the amounts of TAMs of the primary focus and metastasis for most types of breast cancer.

Among CD68+ TAMs, some macrophages perform M1 functions, and CD163+ TAMs are M2-like macrophages, as well as the dual functional significance of both CD68+ and CD163+ TAMs in the immunopathogenesis of breast cancer - anti- and tumoral, with the latter predominating as breast cancer progresses.

Differentiated approach to the analysis of infiltration of BC by CD68+ and CD163+ TAMs depends on the molecular biological type of tumor, and also has individual and intratumoral fluctuations, not always correlated with lymphatic metastasizing. It is necessary to take into account the obtained information for the appropriate extrapolation of the results to other scientific studies.

Key words: M1 M2 macrophages, tumor-associated macrophages, immunohistochemical study, CD68, CD163, ER, PR, HER2, molecular and biological type of breast cancer.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

ІГХ – імуногістохімія, імуногістохімічне дослідження;

Мф – макрофаг;

ПАМ – асоційовані з пухлиною макрофаги;

PM3 – рак молочної залози;

ER – естрогеновий рецептор;

HER2 – (англ. human epidermal growth factor receptor 2) – рецептор 2 епідермального фактора росту людини, або Her-2-neu;

IFN- γ – (англ. interferon gamma) – інтерферон гама;

IL – (англ. Interleukin) – інтерлейкін;

Ki67 – нуклеарний протеїн, продукт гену MKI67, маркер клітинної проліферації;

LPS – ліпополісахариди;

PR – прогестеронової рецептор;

TNF- α – (англ. tumor necrosis factor) – фактор некрозу пухлини альфа.